

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/000283

International filing date: 31 January 2005 (31.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0006436
Filing date: 31 January 2004 (31.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 April 2005 (20.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.**

출 원 번 호 : 특허출원 2004년 제 0006436 호
Application Number 10-2004-0006436

출 원 년 월 일 : 2004년 01월 31일
Date of Application JAN 31, 2004

출 원 인 : 김기영
Applicant(s) KIM KI YOUNG

2005 년 3 월 24 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.01.31
【발명의 명칭】	헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물
【발명의 영문명칭】	Composition comprising Hovenia dulcis Thunb. extract for improvement of kidney function
【출원인】	
【성명】	김기영
【출원인 코드】	4-1995-084010-6
【대리인】	
【성명】	이원희
【대리인 코드】	9-1998-000385-9
【포괄위임등록번호】	2004-005465-5
【발명자】	
【성명】	김기영
【출원인 코드】	4-1995-084010-6
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이원희 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	24 면 38,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권 주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	2 항 173,000 원
【합계】	211,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면 후 수수료】	63,300 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 헛개나무 추출물은 신기능 진단지표인 ALP, BUN 수치가 낮게 나타나므로, 신장 기능 개선 효과가 우수하다.

또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 하이드록시프롤린의 양이 높게 나타나므로, 신장 보호 효과가 우수하다.

또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 지질과산화 지표인 말론디알데하이드의 양이 낮게 나타나므로, 항산화 및 신장 보호 효과가 우수하다.

따라서, 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물 {Composition comprising Hovenia dulcis Thunb. extract for improvement of kidney function}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물에 관한 것이다.

<2> 신장은 몸 속의 물 (체액)의 양과 이온 농도를 적절하게 조절하여, 노폐물 (요소, 요산, 크레아티닌 등)을 소변으로 내보내고, 독성 물질이나 약물, 그리고 대사산물은 독을 없앤 뒤 배설시키는 작용을 한다. 조직에서 지질과산화의 분해산물인 말론디알데하이드 (malonedialdehyde: MDA)와 4-하이드록시논에날 (4-hydroxynonenal : HNE)은 세포손상의 지표로 알려져 있으며, 지질과산화물을 촉매하는 슈퍼옥사이드 디스무타제 (superoxide dismutase)는 세포손상을 회복시키는데 관여한다고 보고되어 있다 (Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. Biochemical Journal 1994;222:1-15; Esterbauer H, Schauer RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free Radical Biology & Medicine 1992;11:81-128.). 알칼린 포스파타제 (Alkaline phosphatase: ALP)와 혈요소질소 (blood urea nitrogen: BUN)는 신기능 대사의 진단 지표로 임상에서 사용되

고 있다. 특히 BUN 수치의 증가는 고질소혈증 (azotemia)에 의한 사구체여과율 (glomerular filtration rate : GFR)의 감소로 나타난다. 참고로 신전성 (prerenal) 고질소혈증은 울혈성 심부전 (congestive heart failure), 쇼크, 과소혈증 (hypovolemia) 및 출혈 등 신장에 저관류상태로 인해 신장의 손상없이 기능저하가 초래되는 것이며, 신후성 (postrenal) 고질소혈증은 신장하부에서 소변의 흐름이 막히는 경우 생기나 그 원인이 교정되면 회복이 가능하다. 고질소혈증이 여러 가지 임상증상, 증후 및 생화학적 이상을 동반하면 요독증 (uremia)이라고 한다. 따라서 요독증은 단순한 생화학적 이상이 아닌 임상증후군이며 신장의 배설기능의 이상 뿐 아니라 대사성, 내분비기능장애, 위장관계, 신경근육계 및 심맥관계에도 장애가 초래된다. 신장 기능의 이상으로 발병되는 질병은 급성 신우신염 (Acute pyelonephritis), 만성 신우신염 (chronic pyelonephritis), 신장 결핵 (Renal tuberculosis), 요로감염증 (UTI), 요로결석 (Urinary stone), 신장암 (Renal cell cancer) 등이 있다.

<3> 한편, 헛개나무 (*Hovenia dulcis* Thunb.)는 갈매나무과 낙엽활엽교목으로 한방에서는 '지구목'이라고 한다. 본초강목에서는 헛개나무가 맛이 달고 평온하며 독성이 없으며, 오장을 부드럽게 하고 윤택하게 하며, 가슴에 번열을 없애주고 갈증을 풀어주며 술독을 풀고, 구토증을 제거하며, 충독을 없애고 다섯 종류의 치질을 치유한다고 되어있다. 또한 간 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 구취제거, 알콜성 간염, 지방간, 간경화 특히 항암효과, 혈압조절, 혈당강하, 간해독, 변비에도 탁월한 효과가 있는 것으로 밝혀졌다.

<4> 이에 본 발명자들은 여러 가지 작용기전을 가지고 있으며, 독성이 적은 약물을 천연물에서 찾던 중, 헛개나무 추출물에서 신장 기능 개선 작용효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<5> 본 발명은 헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물을 제공하고자 한다.

【발명의 구성 및 작용】

<6> 본 발명은 헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 조성물을 제공한다.

<7> 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선을 위한 약학 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.

<8> 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

<9> 본 발명의 조성물에 포함되는 헛개나무의 추출방법은 다음과 같다.

<10> 헛개나무를 물로 깨끗이 세척한 후, 그늘에서 건조시킨다. 건조한 헛개나무를 환류추출기에 넣고, 여기에 생수를 넣고 100℃에서 90분간 가열하여 열수 추출한다. 상기 열수 추출액을 뜨거울때 여과지로 감압 여과한 후, 상기 여과액을 진공증발기를 이용하여 농축한다. 장기간 사용시에는 동결건조기를 이용하여 건조한다. 본 발명에서는 헛개나무의 줄기, 꽃, 잎, 종자 등을 모두 사용할 수 있다.

- <11> 본 발명의 헛개나무 추출물은 신기능 진단지표인 ALP, BUN 수치가 낮게 나타나므로, 신장 기능 개선 효과가 우수하다.
- <12> 또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 하이드록시프롤린의 양이 높게 나타나므로, 신장 보호 효과가 우수하다.
- <13> 또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 지질과산화 지표인 말론디알데하이드의 양이 낮게 나타나므로, 항산화 및 신장 보호 효과가 우수하다.
- <14> 따라서, 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선에 유용하게 사용될 수 있다.
- <15> 본 발명의 조성물은 상기 헛개나무 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <16> 상기 헛개나무 추출물은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 헛개나무 추출물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 헛개나무 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될

수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<17> 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 헛개나무 추출물의 유효용량은 200 내지 600 mg/kg이고, 바람직하기로는 300 내지 400 mg/kg이며, 하루 1~6 회 투여될 수 있다.

<18> 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선을 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

<19> 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선을 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 헛개나무 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 헛개나무 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강

또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 헛개나무 추출물이 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

<20> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

<21> 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g 이다.

<22> 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제,

착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<23> 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

<24> **실시예 : 헛개나무 추출물의 제조**

<25> 헛개나무를 물로 깨끗이 세척한 후, 그늘에서 건조시켰다. 건조한 헛개나무 20g을 환류추출기에 넣고, 1.5ℓ의 생수를 넣고 100℃에서 90분간 가열하여 열수 추출하였다.

<26> 상기 열수 추출액을 뜨거울때 여과지로 감압 여과하였다. 상기 여과액을 진공증발기를 이용하여 농축하였다. 장기간 사용시에는 동결건조기를 이용하여 건조하였다.

<27> 상기 농축액은 동물실험 (2ml/rat/day)에 사용하였다.

<28> **실험예 1 : 랫트에서 사염화탄소의 장기투여로 유발된 신장 손상에 대한 신장 보호 및 신기능 개선 효과**

<29> 본 발명의 헛개나무 추출물의 신장 손상에 대한 신장 보호 및 신기능 개선 효과를 알아보기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<30> **1. 실험동물**

<31> 실험동물은 체중이 약 180~210g인 12주령 Sprague-Dawley 랫트 (다물사이언스, 오산, 한국)를 사용하였고, 사육환경은 온도 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $60 \pm 10\%$ 를 유지하였다. 사료 (퓨리나 사료)와 식수는 자유로이 공급하였고, 밤과 낮을 구분하여 공급하였다.

<32> 2주간 실험실 환경에 적응시킨 실험동물을 ① 정상군, ② CCl_4 투여군, ③ CCl_4 + 헛개나무 추출물 투여군의 3개군으로 나누었으며, 각 군당 10마리씩 배정하였다.

<33> **2. 신장 손상 유도**

<34> 정상군을 제외한 나머지 실험군의 랫트에 올리브 오일과 CCl_4 의 혼합액 1ml /rat/day을 일주일에 3회씩 4주간 투여하여 신장 손상을 유도하였다.

<35> CCl_4 투여군에는 증류수를, CCl_4 + 헛개나무 추출물 투여군에는 상기 실시예에서 제조한 헛개나무 추출물을 각각 2ml /rat/day을 경구투여하였다.

<36> 정상군을 포함하여 각 군의 랫트의 체중을 측정한 뒤에 에테르로 마취시키고, 심장천자 (heart puncture)에 의해 심장에서 채혈하여 2시간 이상 실온에 방치한 후

3000rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻고 -20℃에 보관하였다. 보관된 혈청은 혈청생화학적 검사인 ALP와 BUN을 측정하는데 사용하였다.

<37> 또한, 신장 손상이 유도된 랫트의 신장을 적출하여 인산염 완충액 (pH 7.0) 으로 세척한 후 무게를 측정하였다. 신장조직의 일부는 -75℃에 보관하여 하이드록시프롤린 (hydroxyproline), 말론디알데하이드 (malondialdehyde; MDA) 측정에 사용하였다.

<38> 체중변화는 매주마다 측정하였고, 도살시 신장의 무게변화를 관찰하였다.

<39> 실험성적은 평균치 ±표준편차로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 평균의 차이를 검정할 때에는 Student's *t*-test로 검정하여 P값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

<40> 결과는 표 1에 나타내었다.

<41> 【표 1】

	체중 (g)	신장 무게 (g)	(신장무게/체중) ×100 (%)
정상군	200.8 ±8.6	1.36 ±0.06	0.64 ±0.03
CCl ₄ 투여군	167.3 ±9.4	1.62 ±0.19	0.97 ±0.17
CCl ₄ + 헛개나무 추출물 투여군	190.7 ±0.3	1.52 ±0.15	0.91 ±0.2*

<42> * : p<0.05

<43> 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 헛개나무 추출물의 체중과 신장 무게 변화는 대조군에 비하여 6.6% 유의성 있게 낮게 나타났다.

<44> 3. 혈청생화학적 검사

<45> **1) ALP (Alkalkine phosphatase) 측정**

<46> 3개의 시험관에 ALP 기질완충액 (페닐인산-2-나트륨) 2.0ml를 넣고 37℃에서 3~5
분간 가온하였다. 각 시험관에 혈청시료 50μl, 정제수 50μl, 표준액 50μl를 각각 가
하여 혼합하고 37℃에서 15분간 가온하였다. 각 시험관에 정색시약 2.0ml를 넣고 실
온에서 10분간 방치한 후, 60분 이내에 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

<47> **2) BUN (Blood urea nitrogen) 측정**

<48> 3개의 시험관에 혈청시료 20μl, 정제수 20μl, 표준액 20μl를 각각 가하고, 효소
용액 2.0ml를 각각 넣은 후 혼합하여 37℃에서 5분간 반응시켰다. 각 시험관에 정색
시약 2.0ml를 가하고 혼합하여 37℃에서 10분간 가온 후, 60분 이내에 580nm에서 흡
광도를 측정하였다.

<49> 결과는 표 2에 나타내었다.

<50> **【표 2】**

	ALP (KA)	BUN (mg/dl)
정상군	63.5 ± 1.2	13.6 ± 1.1
CCl ₄ 투여군	156.9 ± 6.1	23.4 ± 2.1
CCl ₄ + 헛개나무 추출물 투여군	143.1 ± 7.9	18.6 ± 2.1*

<51> * : p<0.01

<52> 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신기능 진단지표인 ALP 수치가 대조군보다 17.3% 낮게 나타났으며, BUN 수치는 대조군보다 20.5% 유의성 있게 낮게 나타났다.

<53> 따라서, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 기능 개선 효과가 우수함을 알 수 있다.

<54> 4. 하이드록시프롤린 (Hydroxyproline: hyp) 양 측정

<55> 1) 시약의 조제

<56> ① 아세테이트 시트레이트 완충액 (Acetate citrate buffer)

<57> 소듐 아세테이트 트리하이드레이트 (sodium acetate trihydrate) 50g, 트리소듐 시트레이트 (trisodium citrate) 37.5g, 시트르산 모노하이드레이트 (citric acid monohydrate) 5.5g, 이소프로판올 395ml에 증류수를 가하여 전체 1ℓ가 되게 만든 후, pH를 6.0으로 만들어서 4℃에 보관하여 사용하였다.

<58> ② 클로라민-T (Chloramine-T) 용액

<59> 클로라민-T 84mg을 아세테이트 시트레이트 완충액 10ml에 용해시켜서 사용하였다.

<60> ③ 에리리치 시약 (Ehrlich's reagents)

<61> p-디메틸아미노벤즈알데하이드 (p-Dimethylaminobenzaldehyde) 10g과 60% 퍼클로릭산 (perchloric acid) 11ml를 혼합하여 저장용액을 만들었다. 저장용액 3ml을 취한

다음 이소프로판올 8.0ml와 혼합하여 사용하였다. 에리리치 시약은 사용 직전에 조제하여 사용하였으며, 저장용액은 차광하여 4℃에 보관하였다.

<62> 2) 하이드록시프롤린 양 측정

<63> 냉동 시킨 신장 조직 0.2g을 10ml 유리병에 평량한 후, 6N HCl 4ml를 넣고 균질기 (homogenizer)로 균질화시켜서 110℃에서 10~24시간 건조 오븐에서 가수분해시킨 후, 와트만 여과지를 사용하여 여과시켰다. 이때 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 μ g/50 μ l의 트랜스-하이드록시프롤린 (trans-hydroxyproline) 6N HCl로 희석시킨 표준용액을 시료와 같이 110℃에서 12~14시간 가수분해시켰다. 각 시료와 표준 용액을 50 μ l 유리병에 취하여 완전히 건조시켜서 염산을 제거하였다. 그 후에 50% 이소프로판올 1.2ml를 넣어 침전물을 용해시키고, 클로라민-T 용액 200 μ l를 가하여 10분간 실온에서 반응시킨 후, 1.2ml의 에리리치 반응시약을 넣었다. 50℃에서 90분간 발색시키고 상온에서 냉각시킨 후, 558nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

<64> 신장 조직 중 하이드록시프롤린의 농도는 하기식에 의하여 계산하였다.

<65> $C[\text{신장 조직 } 0.2\text{g의 하이드록시프롤린의 농도}] =$

<66> $[HA(\text{시료의 흡광도}) / SA(1.0\mu\text{g}/50\mu\text{l의 트랜스-하이드록시프롤린 (trans-hydroxyproline) 6N HCl로 희석시킨 표준용액의 흡광도})] \times 80$

<67> $C \times 5 = \text{하이드록시프롤린 양} / \text{g 신장 조직}$

<68> 결과는 표 3에 나타내었다.

<69> **【표 3】**

	하이드록시프롤린의 양 ($\mu\text{g/g}$)
정상군	918.2 \pm 8.7
CCl ₄ 투여군	825.2 \pm 7.6
CCl ₄ + 헛개나무 추출물 투여군	860.4 \pm 9.3

<70> 표 3에 나타난 바와 같이, 본 발명의 헛개나무 추출물의 하이드록시프롤린의 양이 대조군보다 5.1% 높게 나타났다.

<71> 따라서, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 보호 효과가 우수함을 알 수 있다.

<72> **5. MDA (Malondialdehyde) 측정**

<73> 혈청시료 200 μl 또는 균질화 시킨 조직 시료 [1.15% KCl 1.8 ml 에 있는 0.2g 간조직 (또는 신장 조직)]와 희석한 표준물질 (0, 4, 8, 16, 32 nmol/200 μl 테트라메톡시프로판) 200 μl 를 펠콘 시험관에 가하였다. 시료와 희석시킨 표준 용액 200 μl 에 0.2% SDS 100 μl 를 넣고 혼합하여 실온에서 10분간 반응시켰다. 그리고 20% 아세트산 750 μl 와 0.8% 티오바비츠크레이트 (thiobarbiturate) 750 μl 를 가하고 혼합하였다. 그 후에 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시키고 얼음에 넣어 냉각시켰다. 완전히 냉각된 것을 확인한 후에 n-부탄올 2 ml 를 가하고 원심분리하여 상층액의 흡광도를 532nm에서 분광광도계를 사용하여 측정하였다.

<74> 혈청과 조직중 MDA 농도는 다음과 같이 계산하였다.

<75> C[간 조직 (또는 신장 조직) 0.2g (또는 혈청 200 μ l)의 말론디알데하이드의 농도]
= [HA (시료의 흡광도) / SA (표준용액의 흡광도 (8 μ mol/1.15% KCl 200 μ l))] \times 80

<76> C \times 5 = 말론디알데하이드 양 (μ mol/ml)

<77> 결과는 표 4에 나타내었다.

<78> 【표 4】

	말론디알데하이드의 양 (μ mol/ml)
정상군	162.7 \pm 1.6
CCl ₄ 투여군	181.4 \pm 4.4
CCl ₄ + 헛개나무 추출물 투여군	156.6 \pm 4.7*

<79> * : p<0.01

<80> 표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 헛개나무 추출물은 지질과산화 지표인 말론디알데하이드의 양이 대조군보다 15.8% 유의성 있게 낮게 나타났다.

<81> 따라서, 본 발명의 헛개나무 추출물은 항산화 효과 및 신장 보호 효과가 우수함을 알 수 있다.

<82> 실험예 2 : 독성 실험

<83> 본 실험에 사용한 세포주는 vero (신장 세포주)이며, 한국 세포주 은행 (KCLB) 으로부터 구입하였다.

- <84> MTT 저장용액은 인산완충용액 1ml에 MTT 분말 5mg을 용해시킨 후 잘 흔들어준 다음, 0.4 μ m 필터로 여과하여 준비하였다.
- <85> NR 저장용액은 3차 증류수 1ml에 NR 분말 4mg을 용해시킨후 잘 흔들어준 다음, 0.4 μ m 필터로 여과하여 준비하였다.
- <86> 트립신-EDTA는 0.5% 트립신, 5.3mM EDTA를 포함한 것으로 판매되며, 이를 PBS로 10배 희석하여 사용하였다.
- <87> **1) MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]**
분석
- <88> 배지를 제거한 후, 트립신-EDTA 용액 1ml를 넣고 10~20분간 방치하여 세포를 용기로부터 분리하여 15ml 펠콘 튜브에 넣었다. 배양 플라스크에 남아있는 세포를 모두 수거하기 위해서 배지 1ml를 넣고 흔들어서 잔류하는 세포를 수거하여 상기 펠콘 튜브에 넣었다. 세포 부유액 10 μ l를 혈구계 (hemocytometer)에 넣고 세포수를 세었다 (2.5 $\times 10^4$ cell/ml). 세포를 96 웰 플레이트에 50 μ l 씩 (1~2 $\times 10^5$ 세포) 넣은 다음 배지 (DMEM + 10% FBS + 항생물질) 150 μ l를 넣고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 방치하여 세포를 부착시켰다.
- <89> 24시간 지난 후, 96 웰 플레이트에 부착시킨 세포에서 배지를 조심스럽게 제거하였다 (이때 바닥에 부착된 세포가 묻어나오지 않도록 하고 오염을 주의한다). 배지 150 μ l에 상기 실시예에서 제조한 헛개나무 추출물 50 μ l를 넣어 총 부피가 200 μ l가 되게 하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양시켰다. 이때 약제부터 넣으면 세

포에 손상이 크기 때문에 배지를 먼저 넣은 다음 약재를 처리하였다. 배양시킨 후, 96 웰 플레이트를 꺼내어 배지를 제거하였다. 여기에 MTT 염료 $50\mu\text{l}/\text{ml}$ (저장액 $50\mu\text{l}$ + 배지 $950\mu\text{l}$)를 넣고 희석시켜 각 웰에 $50\mu\text{l}$ 씩 넣고, CO_2 배양기에 넣어 4시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거한 후에 DMSO $100\mu\text{l}$ 를 가한 다음 10분 동안 흔들여 준 후, 엘리사 판독기 (ELISA reader)로 540nm 에서 OD (흡광도)를 측정하였다.

<90> 대조군으로는 배지만 넣은 것을 사용하여 생존률을 계산하였다.

<91> **2) NR (Neutral Red: 3-amino-7-dimethylamino-2-methyl phenazine) 분석**

<92> 배지를 제거한 후, 트립신-EDTA 용액 1ml 를 넣고 10~20분간 방치하여 세포를 용기로부터 분리하여 15ml 펠콘 튜브에 넣었다. 배양 플라스크에 남아있는 세포를 모두 수거하기 위해서 배지 1ml 를 넣고 흔들어서 잔류하는 세포를 수거하여 상기 펠콘 튜브에 넣었다. 세포 부유액 $10\mu\text{l}$ 를 혈구계에 넣고 세포수를 세었다 ($2.5 \times 10^4 \text{ cell}/\text{ml}$). 세포를 96 웰 플레이트에 $50\mu\text{l}$ 씩 ($1 \sim 2 \times 10^5$ 세포) 넣은 다음 배지 (DMEM + 10% FBS + 항생물질) $150\mu\text{l}$ 를 넣고, 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간 방치하여 세포를 부착시켰다.

<93> 24시간 지난 후, 96 웰 플레이트에 부착시킨 세포에서 배지를 조심스럽게 제거하였다 (이때 바닥에 부착된 세포가 묻어나오지 않도록 하고 오염을 주의한다). 배지 $150\mu\text{l}$ 에 상기 실시예에서 제조한 헛개나무 추출물 $50\mu\text{l}$ 를 넣어 총 부피가 $200\mu\text{l}$ 가 되게 하고, 37°C , 5% CO_2 배양기에서 24시간동안 배양시켰다. 이때 약재부터 넣으면 세포에 손상이 크기 때문에 배지를 먼저 넣은 다음 약재를 처리하였다.

<94> 배양시킨 후, 96 웰 플레이트를 꺼내어 배지를 제거하였다. 여기에 NR 염료 10 μl /ml (저장액 10 μl + 배지 990 μl) 를 넣고 희석시켜 각 웰에 200 μl 씩 넣고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에 넣어 3시간동안 배양하였다. 다시 배지를 제거한 후, 1% CaCl₂, 0.5% 포름알데하이드 100 μl 를 넣어 세척하였다. 상등액을 제거한 후에 1% 아세트산, 50% 에탄올을 200 μl 가한 다음 10분동안 흔들여 준 후, 엘리사 판독기 (ELISA reader)로 540nm에서 OD (흡광도) 를 측정하였다.

<95> 대조군으로는 배지만 넣은 것을 사용하여 생존률을 계산하였다.

<96> 결과는 표 5에 나타내었다.

<97> 【표 5】

	신장 세포주 (Vero)	
	MTT (%)	NR (%)
헛개나무 추출물	98.40 ±4.1	99.00 ±2

<98> 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 세포주에서 생존에는 위해가 되지 않는 것으로 나타났다.

<99> 따라서, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 보호 효과가 우수함을 알 수 있다.

<100> 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

<101> **제제예 1 : 약학적 제제의 제조**

<102> 1. 산제의 제조

<103> 헛개나무 추출물 2g

<104> 유당 1g

<105> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

<106> 2. 정제의 제조

<107> 헛개나무 추출물 100mg

<108> 옥수수전분 100mg

<109> 유 당 100mg

<110> 스테아린산 마그네슘 2mg

<111> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

<112> 3. 캡슐제의 제조

<113> 헛개나무 추출물 100mg

<114>	옥수수전분	100mg
-------	-------	-------

<115> 유 당 100mg

<116> 스테아린산 마그네슘 2mg

<117> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

<118> 제제예 2 : 식품의 제조

<119> 본 발명의 헛개나무 추출물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

<120> 1. 조리용 양념의 제조

<121> 본 발명의 헛개나무 추출물 20 ~ 95 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

<122> 2. 토마토 케찹 및 소스의 제조

<123> 본 발명의 헛개나무 추출물 0.2 ~ 1.0 중량%를 토마토 케찹 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케찹 또는 소스를 제조하였다.

<124> 3. 밀가루 식품의 제조

<125> 본 발명의 헛개나무 추출물 0.5 ~ 5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

<126> 4. 스프 및 육즙 (gravies)의 제조

<127> 본 발명의 헛개나무 추출물 0.1 ~ 5.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

<128> 5. 그라운드 비프 (ground beef)의 제조

<129> 본 발명의 헛개나무 추출물 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

<130> 6. 유제품 (dairy products)의 제조

<131> 본 발명의 헛개나무 추출물 5 ~ 10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

<132> 7. 선식의 제조

<133> 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<134> 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다.

<135> 본 발명의 헛개나무 추출물을 진공 농축기에서 감압·농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

<136> 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 헛개나무 추출물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

<137> 곡물류 (현미 30중량%, 율무 15중량%, 보리 20중량%),

<138> 종실류 (들깨 7중량%, 검정콩 8중량%, 검정깨 7중량%),

<139> 헛개나무 추출물의 건조분말 (3 중량%),

<140> 영지 (0.5중량%) ,

<141> 지황 (0.5중량%)

<142> **제제예 3 : 음료의 제조**

<143> 1. 탄산음료의 제조

<144> 설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃에서 20~180초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82%를 주입하여 본 발명의 헛개나무 추출물을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

<145> 2. 건강음료의 제조

<146> 액상과당 (0.5%) , 올리고당 (2%) , 설탕 (2%) , 식염 (0.5%) , 물 (75%) 과 같은 부재료와 헛개나무 추출물을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

<147> 3. 야채쥬스의 제조

<148> 본 발명의 헛개나무 추출물 5g을 토마토 또는 당근 쥬스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

<149> 4. 과일쥬스의 제조

<150> 본 발명의 헛개나무 추출물 1g을 사과 또는 포도 주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

【발명의 효과】

<151> 본 발명의 헛개나무 추출물은 신기능 진단지표인 ALP, BUN 수치가 낮게 나타나므로, 신장 기능 개선 효과가 우수하다.

<152> 또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 하이드록시프롤린의 양이 높게 나타나므로, 신장 보호 효과가 우수하다.

<153> 또한, 본 발명의 헛개나무 추출물은 신장 조직에서 지질과산화 지표인 말론디알데하이드의 양이 낮게 나타나므로, 항산화 및 신장 보호 효과가 우수하다.

<154> 따라서, 본 발명의 조성물은 신장 기능 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 약학 조성물.

【청구항 2】

헛개나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 신장 기능 개선용 식품 조성물.